

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

PUB-NO: DE004123107A1
DOCUMENT-IDENTIFIER: DE 4123107 A1
TITLE: Storage and transport of microorganisms - by storing microorganisms as air dried cultures on solid nutrient medium to retain viability for long periods
PUBN-DATE: January 14, 1993

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
RUDAT, AXEL DR	DE
WOLFF, STEVEN	DE

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
RUDAT AXEL DR	DE
WOLFF STEVEN	DE

APPL-NO: DE04123107

APPL-DATE: July 9, 1991

PRIORITY-DATA: DE04123107A (July 9, 1991)

INT-CL (IPC): B65B055/00 , B65D085/50 , C12N001/00 , C12N001/14 , C12N001/18 , C12N001/20 , C12N005/00

EUR-CL (EPC): C12N001/04

US-CL-CURRENT: 435/243

ABSTRACT:

Microorganisms are stored and/or transported in the form of a film produced by culturing the microorganisms under sterile conditions (without access to foreign microorganisms) on a thin film of a gelled or swellable solid nutrient medium initially satd. with water, and air drying the film for a time that is a multiple of the cell division cycle time of the microorganisms. The dried films are removed from the culture vessel under sterile conditions and packaged in polymer film containers.

ADVANTAGE - The microorganisms remain viable for long periods, e.g., 12-36 months. The process is applicable to a wide range of microorganisms, including non-sporogenic bacteria and fungi and the mycelia of higher fungi. In an example, microorganisms were grown on nutrient agar in Petri dishes under ambient conditions for several weeks while allowing the agar to dry. On storage, *Anabaena variabilis* and *Nostoc muscorum* remained viable for 36 months and *Saccharomyces cerevisiae* and *Pleurotus ostreatus* remained viable for 12 months.



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 41 23 107 A 1**

51 Int. Cl.⁵:
C 12 N 1/00
C 12 N 1/20
C 12 N 1/14
C 12 N 1/18
C 12 N 5/00
B 65 B 55/00
B 65 D 85/50
// (C12N 1/18, C12R
1:865) C12N 5/04,
B65D 81/24

21 Aktenzeichen: P 41 23 107.4
22 Anmeldetag: 9. 7. 91
43 Offenlegungstag: 14. 1. 93

DE 41 23 107 A 1

71 Anmelder:
Rudat, Axel, Dr., O-1054 Berlin, DE; Wolff, Steven,
O-1153 Berlin, DE

72 Erfinder:
gleich Anmelder

54 Verfahren zur Langzeitlagerung und Sterilversendung von Mikroorganismen im latenten Lebenszustand

57 Die bisher üblichen Verfahren zur Erhaltung von Stammkulturen sind entweder arbeits- und kostenintensiv oder nur auf bestimmte Organismengruppen anwendbar. Um derartige Nachteile zu beseitigen, wird ein Verfahren geschaffen, bei dem ein breites Spektrum an Mikroorganismen unter sterilen Bedingungen billig und sicher gelagert und dabei vom aktiven in den latenten Lebenszustand überführt werden kann.
Die Mikroorganismen werden unter sterilen Bedingungen in Kulturgefäßen auf einer dünnen, im Vergleich zu den Mikroorganismen großflächigen Schicht eines mit geeigneten Nährstoffen versetzten gelartigen oder quellfähigen, zunächst annähernd wassergesättigten Feststoffes kultiviert und unter Raumbedingungen gelagert, wobei die Nährstoffschicht mit den Mikroorganismen getrocknet wird. Dieses Verfahren kann angewendet werden in allen Sammlungen von Reinkulturen lebender Mikroorganismen für wissenschaftliche oder industrielle Zwecke, in denen die Langzeitlagerung und/oder Versendung der Mikroorganismen unter sterilen Bedingungen von Interesse ist.

DE 41 23 107 A 1

Bisher ist es üblich, Kulturstämme von pro- oder ausgewählten eukaryotischen Organismen in Kultursammlungen auf geeigneten Nährmedien zu kultivieren. Für den Stammerhalt werden die Organismen vor Erschöpfung des Nährmediums auf ein frisches Nährmedium übertragen. Dabei verbleiben die Organismen im aktiven Lebenszustand. Dies kann für eine schnelle Vermehrung eines Kulturstammes aus der Kultursammlung zu Forschungs- oder Produktionszwecken von Vorteil sein. In der Regel verbleiben aber die Stämme für lange Zeit in der Kultursammlung. Zum Zwecke ihres Erhaltes müssen die Organismen ständig umgesetzt werden. Dafür sind Arbeitskräfte notwendig, die die Nährmedien vorbereiten und in Kulturgefäße füllen, diese sterilisieren und schließlich die Organismen umsetzen. Der Inhalt nicht mehr verwendungsfähiger Kulturgefäße muß vernichtet und die Gefäße gereinigt werden. Diese Methode ist arbeits- und kostenintensiv und schließt das Risiko von Kontaminationen mit ein. Andere Verfahren zum Erhalt von Kulturstämmen stellen z. B. die Sporenkonservierung und die Gefriertrocknung dar. Die Sporenkonservierung beschränkt sich jedoch auf sporenbildende Bakterien und Pilze. Bei der Gefriertrocknung wirkt sich nachteilig aus, daß dieses Verfahren für großzellige Mikroorganismen, z. B. Hefen und filamentöse Organismen, nicht geeignet ist.

Ferner ist bekannt, daß Mikroorganismen durch Überführung aus dem aktiven in den latenten Lebenszustand mittels Trocknung in einen lagerfähigen Zustand gebracht werden können (schweizerische Patentschrift Nr. CH 5 57 425 und europäische Patentschrift Nr. EP 6 671). Diese beschriebenen Verfahren sind aber für filamentöse oder mycelartig wachsende Organismen, wie höhere Pilze, nicht geeignet. Außerdem werden Hilfsmittel bzw. Stabilisatoren eingesetzt. Weiterhin ist dadurch, daß bis zum Erhalt des lagerfähigen Produktes Arbeitsschritte in verschiedenen Behältnissen ablaufen, die Gefahr einer Kontamination mit Fremdorganismen erhöht.

Der in Anspruch 1 angegebenen Erfindung liegt das Problem zugrunde, neben ein- bis mehrzelligen Mikroorganismen filamentöse und mycelartig wachsende, großzellige Mikroorganismen in ein und demselben Gefäß bequem, sicher und billig in einen Zustand des latenten Lebens zu bringen, daß sie unter sterilen Bedingungen lange Zeit auch ohne zusätzliche Behandlung gelagert und versendet werden können. Die Mikroorganismen sollen zu einem beliebigen Zeitpunkt wieder in den aktiven Lebenszustand überführt und dabei frei von Kontaminationen gehalten werden können.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, die Mikroorganismen so zu lagern, daß sie im latenten Lebenszustand steril, sicher und mit geringstem Aufwand verpackt, gelagert und versendet werden können.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß Kulturen der jeweiligen Mikroorganismen unter sterilen Bedingungen in Kulturgefäßen auf dünne Schichten eines mit geeigneten Nährstoffen versetzten gelartigen oder quellfähigen, zunächst annähernd wassergesättigten Feststoffes gegeben werden. Anschließend werden die Kulturgefäße gelagert, wobei ausreichend warme und trockene Räume Voraussetzung sind. Nun beginnen die Mikroorganismen auf der Oberfläche des Feststoffes zu wachsen und erleiden schon nach wenigen Wochen durch die beginnende Austrocknung der Nährstoffschicht einen Wassermangel. Die Wirkung

dieses zunehmenden Wassermangels, hervorgerufen durch ein Absinken des Wasserpotentials in der Nährstoffschicht, konzentriert sich nicht auf wenigen Stunden, sondern erstreckt sich über mehrere Tage. Diese Zeit ist ausreichend, damit auch großzellige Mikroorganismen nicht vertrocknen und absterben, sondern vom aktiven zum latenten Leben übergehen. Die dünne Nährstoffschicht mit den latent lebensfähigen Mikroorganismen wird nun noch so lange getrocknet, bis ein dünner fester Nährstoffilm entsteht, der ohne weiteres Zutun in der Lagerung belassen werden kann.

Dieses zufällig gefundene Verfahren erlaubt es, die so behandelten Mikroorganismen unter geeigneten Bedingungen lange Zeit zu lagern. Die Lagerzeit ist von der Organismenart abhängig und kann wenige Jahre bis viele Jahrzehnte betragen. Wünscht man die Überführung der so gelagerten Organismen aus dem latenten wieder in den aktiven Lebenszustand, so wird eine für die Kultivierung des Mikroorganismus geeignete flüssige und sterilisierte Nährlösung auf die getrockneten Nährstoffilme gegeben. Unter geeigneten Kultivierungsbedingungen keimen die so befeuchteten Mikroorganismen bereits nach wenigen Tagen bis Wochen aus und können durch Umsetzen steril vermehrt werden.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung ist im Anspruch 2 der Erfindung angegeben. Die getrockneten Nährstoffilme mit den latent lebensfähigen Organismen können vom Boden der Kulturgefäße abgelöst werden. Das Ablösen läßt sich wesentlich erleichtern, wenn der Boden des Kulturgefäßes vor dem Sterilisieren und Einfüllen des Nährmediums mit einer wasserabweisenden, hitzebeständigen und biokompatiblen Substanz dünn ausgekleidet wurde. Die bevorzugte Substanz ist ein Öl und Silikonöl ist das bevorzugte Öl.

Die abgelösten Nährstoffilme können leicht in kleine Stücke zerschnitten werden (z. B. Kantenlänge 1 cm) und unter sterilen Bedingungen in selbstklebende, sterilisierte Polyäthylenfolie verpackt werden. Dazu schneidet man größere Stücke aus Polyäthylenfolie (z. B. Kantenlänge 2 cm) aus. Ein Stück Nährstoffilm wird nun im Zentrum der Polyäthylenfolie positioniert und mit einem zweiten Stück Polyäthylenfolie abgedeckt. Anschließend drückt man die beiden Polyäthylenfolien an den Rändern fest zusammen. Solche Packungen können auch unter unsterilen Bedingungen gelagert werden. Diese Art der Verpackung ermöglicht es, gewünschte Mikroorganismen steril, sicher und mit geringstem Aufwand und Risiko (z. B. in einem Brief) zu versenden.

Wünscht man die Überführung der auf diese Art und Weise verpackten und gelagerten bzw. versendeten Organismen aus dem latenten in den aktiven Lebenszustand, so zieht man unter sterilen Bedingungen die beiden Polyäthylenfolien auseinander und kann das Stück Nährstoffilm mit den latent lebensfähigen Organismen steril entnehmen und einer Vermehrung zuführen.

Die mit der Erfindung erzielten Vorteile bestehen insbesondere darin, daß die Mikroorganismen nicht mit dem Quellmittel gemischt als Suspension kultiviert, sondern in getrennten Schichten, bestehend aus Nährmedium und Quellmittel einerseits und Mikroorganismen andererseits, in Kulturgefäßen aufgetragen und gelagert werden. Die Überführung der Mikroorganismen vom aktiven in den passiven Lebenszustand mittels Trocknung auf im Vergleich zu den Mikroorganismen großflächigen Nährstoffschichten ermöglicht es, nicht nur ein- oder mehrzellige oder nur sporenbildende, sondern ein breites Spektrum an Mikroorganismen, überraschenderweise z. B. auch Mycelien höherer Pilze, zu

trocknen und lange Zeit zu lagern. Vorteilhaft ist weiterhin, daß durch die Trocknung und Lagerung in ein- und demselben Gefäß ohne Zugabe von Hilfs- oder Zusatzstoffen die Gefahr einer Kontamination mit Fremdorganismen auf ein Minimum beschränkt ist.

5

zeichnet, daß die Nährstofffilme mit den im latenten Lebenszustand befindlichen Mikroorganismen unter sterilen Bedingungen dem Kulturgefäß entnommen, in Kunststoffolie verpackt, gelagert und/oder versendet werden können.

Beispiele

In mit Silikonöl ausgekleidete, sterilisierte Petrischalen wurden die für die Kultivierung der jeweiligen Mikroorganismen geeigneten, mit Agar verfestigten Nährmedien gegeben. Auf diesem Nähragar wurden die Mikroorganismen kultiviert und unter Raumbedingungen gelagert. Während der Vermehrung der Mikroorganismen kam es gleichzeitig zur Austrocknung der Nährstoffschicht. Nach wenigen Wochen waren die Mikroorganismen vom aktiven in den latenten Lebenszustand übergegangen. Die Petrischalen mit den so behandelten Mikroorganismen konnten lange Zeit unter Raumbedingungen weiter gelagert werden (Tabelle).

20

Eine zweite Möglichkeit der Lagerung bestand darin, die ausgetrockneten Nährstoffschichten mit den im latenten Lebenszustand befindlichen Mikroorganismen herauszulösen und in Polyäthylenfolie zu verpacken. Diese Packungen wurden sowohl unter sterilen als auch unsterilen, aber staubgeschützten Bedingungen in Petrischalen gelagert. Ein Teil der Packungen wurde in Briefsendungen verschickt.

25

Nach bestimmten Lagerungszeiten (Tabelle) wurden Proben der im latenten Lebenszustand befindlichen Mikroorganismen aus den Petrischalen bzw. den Polyäthylenpackungen unter sterilen Bedingungen entnommen und in geeigneten Nährmedien kultiviert. Die so gewonnenen Kulturen der verwendeten Mikroorganismen zeigten eine gute Auskeimungsrate und waren frei von Kontaminationen.

35

Tabelle

Organismenart	Lagerungszeit (Monate)	40
Anabaena variabilis	36	
Nostoc muscorum	36	
Saccharomyces cerevisiae	12	45
Pleurotus ostreatus	12	

Patentansprüche

50

1. Verfahren zur Langzeitlagerung und Sterilversendung von Mikroorganismen im latenten Lebenszustand, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Kulturen unter sterilen Bedingungen auf einer dünnen, im Vergleich zu den Mikroorganismen großflächigen Schicht eines mit Nährstoffen versetzten gelartigen oder quellfähigen, zunächst annähernd wassergesättigten Feststoffes vermehrt werden, wobei durch die Art des Kulturgefäßes das Eindringen von Fremdorganismen verhindert und das Entweichen von Wasserdampf ermöglicht wird, so daß die Kulturen mit der Feststoffschicht an der Luft zu einem Film getrocknet werden, die Trocknungszeit ein Vielfaches der für den Zellteilungszyklus erforderlichen Zeit beträgt und die Kulturen so lange Zeit weiter gelagert und/oder versendet werden können.

55

60

65

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekenn-

- Leerseite -

THIS PAGE BLANK (USPTO)